

THESIS

MUNICH

1967

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG
DES LIPOIDSTOFFWECHSELS IN DEN NEBENNIEREN
VON RATTEN NACH EINER FORMALINVERGIFTUNG

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Otto L Hauck

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels
in den Nebennieren von Ratten nach einer Formalinver-
giftung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
OTTO HAUCK
aus Lindenberg (Pfalz)

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv.-Doz.Dr.D.EBERHAGEN
Korreferent:	Prof.Dr.W.SEITZ
Dekan:	Prof.Dr.F.HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1967

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0207

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	
Das Verhalten der Gesamtlipoide	7
Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren	8
Das Verhalten der Phosphatide und ihrer Fettsäuren	11
Das Verhalten der Triglyceride und ihrer Fettsäuren	14
Problemstellung und Zielsetzung	14
<u>Beschreibung der Versuche</u>	
Vorbereitung der Tiere	16
Gewinnung und Reinigung der Gesamtlipoide	16
Auftrennung der Gesamtlipoide	17
Gewinnung der Fettsäuremethylester	19
Chromatographische Trennung der Lipid-spaltprodukte	21
Gaschromatographische Untersuchung der Fettsäuremethylester	21
Reagenzien	22
<u>Ergebnisse</u>	23
<u>Diskussion</u>	
Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren sowie des freien Cholesterins	42
Das Verhalten der Phosphatide und ihrer Fettsäuren	47
Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	52
Lebenslauf	57

Verhalten der Gesamtlipoide

Erstmals wurde das Vorhandensein von Fetten in den Nebennieren im Jahre 1846 von Simon und Ecker erkannt, die im histologischen Präparat fettropfenartige Einlagerungen entdeckten (Zit. n. Bourne) (1). Dieser Befund wurde von Virchow 1857 (2) bestätigt. Rosenheim und Tebb (3) isolierten und identifizierten die wichtigsten Lipoidkomponenten, wobei sie außerdem den charakteristisch hohen Gehalt an Cholesterinestern feststellten. Borberg (4) kam im Jahre 1915 zu den gleichen Ergebnissen und stellte außerdem große Mengen ungesättigter Fettsäure in diesem Organ fest. Speziell die Arachidonsäure wurde 1934 von Ault und Brown isoliert. (5)

Gehalt und Zusammensetzung der Nebennierenlipoide sind außer von der Ernährung vor allem vom Funktionszustand der Organe abhängig, wie zahlreiche Beobachtungen schon um die Jahrhundertwende ergaben. (6,7) Auf Grund dieser vielfältigen Versuchsergebnisse stellten Goormaghtigh und Elaut (8) die Hypothese auf, daß die Lipoide in den Rindenzellen zum Aufbau der Rindenhormone (Corticoide) verwendet werden. Dabei sollen bei hoher Sekretions- und Syntheserate derselben die Zellen von den Fettstoffen entspeichert werden. Zu Zeiten geringer Nebennierenaktivität werden die Lipoide wieder für den Bedarfsfall gespeichert. Bei lange andauernder Ausschüttung der Rindenhormone kommt es zur Erschöpfung der Lipoidreserven, also histologisch ebenfalls zum Bild einer Lipoidentspeicherung der Nebennierenrinde. Dieser Zusammenhang zwischen Lipoidgehalt und Aktivität des Organs wurde durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt (Übersicht siehe Wolman (9) 1964). In Anlehnung an dieses Konzept hat Selye (10,11,12) seine Lehre vom dreiphasigen "allgemeinen Adaptionssyndrom" aufgestellt.

Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren

Da das Cholesterin und seine Ester sich von den anderen Lipoiden durch ihre Doppelbrechung unterscheiden, konnte frühzeitig erkannt werden, daß in erster Linie diese Verbindungen an den beschriebenen Zellveränderungen beteiligt sind (13,14). Ähnlich wie der Cholesteringehalt verhält sich der Vitamin C-Gehalt (15). Beide stehen in enger Beziehung zum ACTH-Gehalt des Blutes und damit zur Corticoid-Sekretion, wie sich durch Verabreichung dieses Hormons an Ratten zeigen ließ (16,17,18,19).

Srere u. Mitarbeiter wiesen 1948 nach (20), daß Cholesterin in den Nebennieren selbst aus Acetat synthetisiert wird. Die Umwandlung des Cholesterins zur ersten Vorstufe der Corticoide, dem pregnenolon, geht dann nach Dorfman u. Mitarb. (22) durch oxydative Abspaltung der Seitenkette nach Einführung von Hydroxylgruppen an C 20 und C 22 vor sich. Die Hydroxylierung geschieht unter Beteiligung von O_2 und $NADP.H + H^+$ (21,22,23,24).

Die Bedeutung der Cholesterinester in der Nebenniere für die Synthese der Corticoidhormone wurde deutlich, als Hechter und Mitarb. (25,26) bei Perfusionsversuchen mit Rindernebennieren Cholesterin zu Cortison und Hydrocortison umwandelten. Dailey u. Mitarb. (27,28,29,30) fanden, daß bei der Inkubation mit Nebennierenhomogenat besonders das mit ungesättigten Fettsäuren veresterte ^{14}C -Cholesterin in markierte Corticoide umgesetzt wurde. Dementsprechend halten Hikasa u. Mitarb. (31) das Cholesterinarachidonat für den eigentlichen Vorläufer der Nebennierenrindenhormone. Der Arbeitskreis um Liebermann hingegen nimmt an, daß das Cholesterinsulfat die aktive Stoffwechselform des Cholesterins darstellt. Er konnte die

in vivo-Umsetzung von Cholesterinsulfat zu Dehydroisandrosteron nachweisen (32) und diese Verbindung aus Rindernebennieren isolieren (33).

Von Sayers u. Mitarb. (19) wurde die Abhängigkeit des Cholesteringehalts in der Nebenniere vom Funktionszustand des Organs gezeigt. Popjak konnte nachweisen, daß die Cholesterinester für die experimentell erzeugten Schwankungen des Gesamtcholesteringehaltes verantwortlich waren und daß der Gehalt an freiem Cholesterin bemerkenswert konstant blieb. (34)

Wie der Cholesterinestergehalt, so ist auch die Zusammensetzung der am Cholesterin gebundenen Fettsäuren vom Funktionszustand des Organs abhängig. Dailéy u. Mitarb. (29) fand bei einer Reihe von Säugetieren einen bemerkenswert hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem an Linolsäure, Arachidonsäure und Docosatetraensäure. Bei der lipoid-chemischen Aufarbeitung autoptisch gewonnener menschlicher Nebennieren hatte es sich ergeben (35) daß in den histologisch als lipoidentspeichert beurteilten Organen der Cholesterinestergehalt nur etwa ein Zehntel der Werte betrug, die in den histologisch als normal beurteilten Nebennieren gefunden wurden (bezogen auf das Trockengewicht). Dabei waren die Ester der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren weit stärker verringert als die der hochungesättigten Fettsäuren. Auffallend war jedoch bei den dem histologischen Bild nach als im Bereich der Norm liegend beurteilten Organen der hohe Eikosatriensäuregehalt der Cholesterinester, der in einigen Fällen doppelt so hoch wie der Arachidonsäuregehalt lag (36). Riley (37) berichtete über ähnlich hohe C₂₀-Triensäurewerte in den Cholesterinestern von ebenfalls autoptisch gewonnen Nebennieren.

Ein derartiger Eikosatriensäure- Eikosatetraensäure-Quotient findet sich sonst nur in den Lipoidextrakten von Tieren, die mit einer zum Mangel an essentiellen Fettsäuren (Linol- Linolensäure) führenden Diät gefüttert wurden (38). Den Zusammenhang zwischen Corticoid-synthese und die Fettsäurezusammensetzung der mit Mangel-diät ernährten Tiere versuchten Tamaki (39) u.a. zu klären, indem sie bei in vivo-Versuchen mit Ratten die Corticoidgrundsekretion als auch den Corticoidausstoß nach ACTH-Gabe untersuchten. Dabei war der Corticoid-spiegel gegenüber den Kontrolltieren stark erniedrigt. Verantwortlich für diese Funktionseinbuße wurde von Hlikasa u. Mitarb. (31) der Mangel an Cholesterinarachidonat gemacht, in dem die Autoren - wie bereits erwähnt - einen direkten Vorläufer der Nebennierenhormone sehen.

Das Verhalten der Phosphatide und ihrer Fettsäuren

Brown u. Mitarb. (40) beschäftigten sich 1937 mit der Untersuchung der Phosphatide von Rindernebennieren. Sie fanden einen Phosphatidgehalt, der mehr als die Hälfte der Gesamtlipide ausmachte. Oleson und Blook (41) berichteten bei Meerschweinchen über einen ähnlichen Gehalt bei Bezug auf das Organfrisdgewicht; der Gesamtlipoidgehalt hatte jedoch gegenüber den Rindernebennieren den dreifachen Wert. Die bisher beim Menschen gefundenen Werte lagen noch tiefer. Eberhagen u. Mitarb. (35) fanden, daß die Phosphatide menschlicher Nebennieren 10-15% der Gesamtlipide ausmachten; die Werte stiegen aber in den entspeicherten Organen auf etwa ein Drittel der Gesamtlipide an, da der Lipoidverlust fast ausschließlich auf einen Cholesterinesterschwund zurückzuführen war. Bei Bezug auf das Organtrockengewicht fanden sich konstante Werte. Der von Riley (37) ermittelte Phosphatidgehalt lag auf ähnlicher Höhe. Die Phosphatidfraktion einer menschlichen Nebenniere mit normaler histologischer Struktur setzt sich nach Eberhagen (42) folgendermaßen zusammen: 10% Kephaline, 45% Lecithin plus Acetalphosphatide, 10% Lysolecithin und 33% Shingomyelin.

Wie auch bei den Cholesterinestern läßt sich ein hoher Gehalt an Polyenfettsäuren in den Phosphatiden feststellen: dabei dominiert die Arachidonsäure. Ault u. Brown (43) gaben im Jahre 1934 ihren Gehalt mit 22% der Gesamtphosphatidfettsäuren an. Später fanden Klenk u. Dittmer (44) auch hochungesättigte C_{22} -Fettsäuren und 1950 isolierten Riemenschneider u. Mitarb. (45) neben der C_{20} -Tetraensäure auch eine C_{20} und C_{22} -Pentaensäure, ohne jedoch deren Konstitution zu ermitteln. Dies geschah

durch Klenk u. Eberhagen 1960 (46), die folgende Polyenfettsäuren aus Rindernebennieren isolierten:

$\Delta 5,8,11$ und $\Delta 8,11,14$ Eikosatriensäure (1,5%)

$\Delta 5,8,11,14$ -Eikosatetraensäure (19%)

$\Delta 5,8,11,14,17$ -Eikosapentaensäure (2%)

$\Delta 7,1,13,16$ -Docosapentaensäure (1,5%).

Erstaunlicherweise konnte die in fast allen Organen vorkommende am stärksten ungesättigte Fettsäure, die C_{22} -Hexaensäure, in den Nebennieren noch nicht nachgewiesen werden, obwohl im Blutplasma in einer Konzentration von etwa 10 mg% diese vorhanden ist (42,47,48).

In menschlichen Nebennieren sind die Phosphatidfettsäuren erheblichen Schwankungen unterworfen, wie Untersuchungen von Eberhagen u. Mitarb. (35) 1963 zeigten. Unter den hochungesättigten Fettsäuren variieren vor allem die Werte für die C_{20} - und C_{22} -Tetraensäure. Der Schwankungsbereich für die Arachidonsäure lag zwischen 10 und 25% der Gesamtphosphatidsäuren. Riley (37) kam zu dem gleichen Ergebnis. Während man bei den Cholesterinestern eine Korrelation zum histologischen Bild fand, war dies hier nicht möglich. Die Bedeutung der Veränderungen bei den Phosphatiden und deren Fettsäuren ist nur verständlich bei Kenntnis der biologischen Funktion der Phosphatide in der Zelle. Darauf soll jetzt kurz eingegangen werden.

Alle membranösen subzellulären Partikel enthalten Lipide und besonders Phosphatide. Diese sind nicht nur von Bedeutung als Bausteine der Zellstrukturen mit Membrancharakter, sie nehmen auch nach den Untersuchungen von Green und Fleischer (49) durch Einschaltung in das mitochondriale elektronenübertragende System an der Endoxydation und damit an der Bereitstellung von Energieträgern für endergone Prozesse teil. Es liegen Hinweise dafür vor, daß die mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur

Ausübung wichtiger Mitochondrienfunktionen erforderlich sind (50,51) und es wird vermutet, daß sie zur Aufrechterhaltung der räumlichen Anordnung bzw. zur Einstellung einer kritischen Dielektrizitätskonstante in den enzymatischen Wirkungszentren erforderlich sind. Die mehrfach ungesättigten Säuren vom Ölsäuretyp sind dazu offensichtlich nur bedingt in der Lage. Die Mitochondrienphosphatide haben einen Gehalt an hochungesättigten Fettsäuren von fast der Hälfte der Gesamphosphatidsäuren. Die quantitativ wichtigste Säure ist wieder die Arachidonsäure (50,51). Dies legt die Annahme nahe, daß die Polyenfettsäuren für die Herstellung eines funktionell vollwertigen Phosphatidverbandes wichtig sind.

Ito u. Johnson (52), die mit Lebermitochondrien von fettfrei ernährten Ratten arbeiteten, fanden zwar keine Beeinträchtigung der oxydativen Phosphorylierung, jedoch im Vergleich zu normalen Mitochondrien eine größere Störanfälligkeit derselben gegenüber experimentellen Einflüssen. Sie folgerten aus den elektronenoptisch erkennbaren Strukturänderungen dieser Zellorganellen durch den Mangel an essentiellen Fettsäuren bedingte Abweichungen in den mit der Atmungskette gekoppelten Reaktionen.

Am Aufbau des Zellkerns sind die Phosphatide nur durch Bildung der Kernmembran beteiligt (53).

Auch in der Mikrosomenfraktion findet sich ein hoher Gehalt an Phosphatiden und deren Fettsäuren, deren Zusammensetzung dem der Mitochondrien etwa entspricht. (54,55) Über ihre Funktion gibt es bis jetzt allerdings noch wenig Untersuchungen.

Nähere Einzelheiten über ihre Bedeutung für die Struktur und die Funktionsfähigkeit der Zellmembran liegen noch

nicht vor, jedoch fand sich in den Phosphatiden der Organe mit ausgesprochener Membranfunktion, wie Lunge (56) und der Placenta (57) nur geringe Mengen mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

Das Verhalten der Triglyceride und ihrer Fettsäuren

Den Neutralfetten mit Glyceridcharakter wird allgemein nur eine biologische Bedeutung als Reservestoff des Energiehaushaltes zuerkannt. Während nach früheren Angaben von diesen Verbindungen nur die Monoglyceride in Form von Monopalmitin nachgewiesen wurden, konnten Eberhagen u. Mitarb. (35) u. Riley (37) erhebliche Mengen Triglyceridanteile an den Gesamtlipoiden feststellen. Die Fettsäurezusammensetzung unterschied sich jedoch nicht von den in der Literatur für das menschliche Depotfett angegebenen Werten, so daß es nicht nötig erscheint, ihre Bedeutung für Struktur und Bedeutung der Nebennieren zu erörtern.

Problemstellung und Zielsetzung

Die Cholesterinester sind - wahrscheinlich als Depotform des freien Cholesterins - von großer Bedeutung für eine der wesentlichen Organfunktionen der Nebennieren, nämlich für die Synthese der Corticoidhormone. Nach den Untersuchungen von Eberhagen (63) kommt es im Verlauf einer ACTH- oder stressbedingten Stimulierung der Nebennieren bei Ratten zu einer typischen, in Abhängigkeit zur Art und zum Ausmaß der Reizung stehenden Veränderung des Cholesterinestergehaltes. Bei der initialen, 6-12 Std. lang anhaltenden Verminderung dieser Verbindungen zeigten die Ester je nach ihrem Fettsäureanteil ein differentes Verhalten. Bei den Phosphatiden bleibt zwar die Gesamtmenge relativ unbeeinflusst von der Organstimulie-

rung, charakteristische Schwankungen ergeben sich aber in der Zusammensetzung ihrer Fettsäuren und hier in erster Linie der Arachidonsäure.

Bei den vorliegenden Untersuchungen sollte zum Vergleich der Einfluß einer Formalin-Vergiftung in einer Dosierung, die bereits bei einem Teil der Tiere zum Tode führte, auf die Rattennebennieren ermittelt werden. Es ging dabei einerseits um die Erfassung der direkten Giftwirkung auf das Organ, andererseits sollten die lipoidchemischen Organveränderungen nach einer akut-letalen Intoxikation untersucht werden.

METHODIK

Vorbereitung der Tiere

Für die Versuche wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten der gleichen Zucht mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150-250 g verwendet. Die Ratten waren unter identischen Bedingungen aufgewachsen und besaßen etwa das gleiche Körpergewicht. 8 Tage vor Versuchsbeginn wurden sie ausschließlich mit Wasser und Brot ad libitum gefüttert.

Die als Kontrollgruppe vorgesehenen Tiere erhielten in Äthernarkose 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung intraperitoneal verabreicht, den eigentlichen Versuchstieren wurde in gleicher Weise die zur Beeinflussung des Nebennierenstoffwechsels verwendete Substanz injiziert. Die Kontrolltiere wurden 2 Stunden, die Versuchstiere zu den jeweilig angegebenen Zeiten nach der Injektion durch Eröffnen des Herzmuskels in Äthernarkose getötet.

Gewinnung und Reinigung der Gesamtlipoide

Die Nebennieren wurden unmittelbar nach dem Tod der Tiere entnommen und sorgfältig von anhaftendem Fettgewebe freipräpariert. Die bindegewebige Kapsel konnte wegen der Kleinheit der Organe nicht mitentfernt werden. Die Organe der zur gleichen Versuchsgruppe gehörenden Tiere wurden vereinigt und zur Bestimmung des Gewebefrischgewichtes unmittelbar anschließend auf einer Halbmikrowaage gewogen. Nach Zusatz von 1,0 ml physiologischer NaCl-Lösung wurden sie mit einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde in die 20-fache Menge Chloroform-Methanol (2:1 V/V) eingetragen und nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur abfiltriert.

Der Filtrationsrückstand wurde bis zur Gewichtskonstanz bei etwa 120°C im Trockenschrank getrocknet, er wird im folgenden als extrahierter Geweberückstand bezeichnet. Die Ermittlung seines Desoxyribonucleinsäuregehaltes (DNS-Gehalt) erfolgte nach Schmidt, Tannhauser und Schneider (58).

Das Filtrat wurde mit dem 0,2-fachen Volumen Wasser in einem Meßzylinder geschüttelt und die nach Trennung der Phasen erhaltene obere Schicht sorgfältig abgesaugt. Sie wurde bei etwa 80°C zur Trockene gebracht und der Rückstand im folgenden als wasserlösliche Extraktionsstoffe bezeichnet. Die untere Phase mit den auf diese Weise nach Folch u. Mitarb. (59) gereinigten Lipoiden wurde im Rotationsverdampfer bei Badtemperatur nicht über 40°C eingedampft und die Inhaltsstoffe im Vakuumexsiccator getrocknet. Nach dem Wiegen wurden die Gesamtlipoide in 100 ml Chloroform gelöst und an aliquoten Teilen die Bestimmung des Gesamtcholesterins nach der Methode von Zak u. Mitarb. (60) sowie die Bestimmung des Lipoidphosphors nach Bartlett (61) durchgeführt.

Auftrennung der Gesamtlipoide

Die Zerlegung des Lipoidgemisches in die Cholesterinester, Triglycerid-, Cholesterin- und Phosphatidfraktion wurde auf kleinen Kieselgelsäulen vorgenommen.

Die Säulen wurden aus Glasrohren von 1 cm Durchmesser mit einer Länge von 20-25 cm hergestellt und unten zur Spitze ausgezogen. Als Füllmaterial dienten 5,5 g Kieselgel Mallinckrodt 100 mesh, das 3-5 Tage in einem Exsiccator in einer Petrischale (als ca. 1 bis 2 cm dicke Schicht) über Wasser gestanden hatte und dann als petrolätherische Suspension in die Säule gegeben wurde. Nach der

Sedimentation des Kieselgels betrug die Füllhöhe 12-13 cm. Eine genau passende, entfettete Filterscheibe wurde auf das Kieselgel gelegt; dann wurde die Füllung mit einem Glasstab bis zu einer Höhe von 10-11 cm zusammengedrückt. Auf diese Weise erhielt man eine Säule mit guten Trenneigenschaften. Der überstehende Petroläther wurde abgeschüttet und dann sofort das in 1 ml gelöste Lipoidgemisch in die Säule gebracht. Nachdem die Lösung vollständig in die Füllung eindrainiert und mit Petroläther nachgespült war, begann die Elution mit 10 ml Petroläther und jeweils 50 ml 2%igem Äther in Petroläther, Chloroform und Chloroform-Methanol 1:10 (V/V).

Es wurden jeweils 4 Säulen gleichzeitig laufengelassen. Das Eluat wurde durch einen Fraktionssammler als 2 ml-Fractionen aufgefangen. Eine Motorspritze drückte die Eluentien durch die Säulen, damit eine gleiche Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase in allen 4 Säulen vorhanden war. Als beste Lösung hatte sich hierbei das Infussionsgerät Unita I der Fa. B. Braun Apparatebau, Melsungen, erwiesen. Das Gerät kann gleichzeitig mit maximal 6 Glasspritzen betrieben werden und erlaubt eine große Variationsbreite bei höchster Konstanz der Pumpgeschwindigkeit. Mit Hilfe eines Zeitschaltwerks erfolgte die Festlegung des Volumens der Einzelfractionen.

Jede Säulenfraction wurde dünnschichtchromatographisch nach Zöllner und Wolfram (62) untersucht. In der Äther-Petroläther-Fraction waren die Cholesterinester (CE I), in der Chloroformfraction Tri-, Di- und Monoglyceride, das freie Cholesterin und eine 2. Cholesterinesterfraction enthalten. (CE II). Mit dem Chloroform-Methanol-Gemisch wurden die Phosphatide von der Säule gewaschen. Auf eine Unterfractionierung dieser drei Elutionsfractionen

nen wurde mit Ausnahme der Chloroformfraktion verzichtet, da die zur Verfügung stehenden Substanzmengen sehr gering waren. Die mit Chloroform eluierte Mischfraktion wurde auf 0,5 mm dickem aktiviertem Kieselgel G-Dünnschichtplatten im Fließmittelsystem Äther-Petroläther 5:95 (V/V) in die CE II -Fraktion und die übrigen Neutralfette zerlegt. Das Glyceridgemisch bestand zum überwiegenden Teil aus Triglyceriden.

Gewinnung der Fettsäuremethylester

In Anbetracht des sehr geringen zur Verfügung stehenden Materials wurde für die weitere Aufarbeitung der Lipoidfraktionen die von Eberhagen entwickelte Mikroarbeitsmethode verwendet (63). Behielt man nämlich - zwar unter gewisser Reduzierung der Größenverhältnisse von Geräten und Lösungsmittelvolumina - die allgemein in der Laborpraxis üblichen Techniken bei, so träten beim Arbeiten mit Substanzmengen, die unter einer kritischen Grenze von etwa 10-30 mg lagen, eine Reihe von Störeffekten auf, die das Untersuchungsergebnis verfälschten.

Die bei den vorliegenden Untersuchungen angewandte Mikrotechnik verwendete ausnahmslos Lösungsmittel - und Reagenzmengen von 1-2 ml und es wurden bei Leerversuchen - d.h. bei der Durchführung eines kompletten Analysengangs ohne Substanzeinsatz - keine auf Schmutzeffekten beruhenden "Substanzen" nachgewiesen. Die apparative Ausrüstung ist bei Eberhagen angegeben (63).

Zur Umesterung wurden die verschiedenen Säulenfraktionen in einem Zentrifugenglas mit rundem Boden eingedampft und dann in 2 ml Methylacetat und 2 ml 5%iger wasserfreier methanolischer HCl (Herstellung s. Eberhagen (64)) gelöst.

Die Lösung wurde 1 Stunde lang unter Rückfluß gekocht. Der Zusatz von Methylacetat sollte nicht nur die Lösungsverhältnisse für sonst schlecht lösliche Lipide verbessern (57), sondern er sorgte auch für ein gleichmäßiges Abspülen der Röhrchenwand durch das kondensierende Lösungsmittel. Als Siedesteinchen wurden etwa 1mm große Tonstücke verwendet. Nach dem Erkalten der Lösung erfolgte die Extraktion der lipidlöslichen Bestandteile - in erster Linie der Methylester -. Dazu wurde das Zentrifugenglas mit einer Reagenzglasklammer an einem Stativ befestigt, 1,0ml H_2O und 1,5 ml Äther/Petroläther (Kp 30-60°C) 1:1 (V/V) zugesetzt und ein absolut fettfreies Rührstäbchen in das Röhrchen gebracht.

Mit dem Magnetrührer wurde dann der Inhalt so rasch durchmischt, daß keine Phasen mehr erkennbar waren. Zum Schutz vor Oxydation war zuvor auf das Zentrifugenglas eine Gasleitungshaube aufgesetzt worden, durch die ein geringer Stickstoffstrom getrieben wurde. Seine Geschwindigkeit konnte mit einem einfachen Blasenähler kontrolliert werden, damit kein Lösungsmittel abgeblasen wurde.

Nachdem das Phasensystem 3 Minuten lang homogenisiert worden war, ließ man die Phasen trennen. Die petrolätherische obere Phase, die die lipoiden Bestandteile enthielt wurde mit der Lösungsmittelpipette fast vollständig abgesaugt. Mit 0,5 ml frischem Petroläthergemisch wurde die Innenwand des Röhrchens sorgfältig abgespült und das Lösungsmittel entfernt. Nach erneuter Zugabe von 1,5 ml Äther-Petroläther wurden die Phasen wieder in der beschriebenen Weise mit dem Magnetrührer 3 Minuten lang verteilt und die Extraktion wiederholt. Insgesamt genügten 3 Extraktionsvorgänge zur vollständigen Erfassung der lipoiden Substanzen.

Chromatographische Trennung der Lipidspaltprodukte

Der petrolätherische Extrakt aus der Methanolysereaktion enthielt neben den Fettsäuremethylestern noch unverseifbares Material wie Cholesterin, Sphingosin u.a. Es mußte entfernt werden, da es bei der gaschromatographischen Analyse störte. Die Abtrennung gelang am besten auf chromatographischem Wege mit den gleichen Säulen, wie sie bei der Auftrennung der Gesamtlipide verwendet wurden. Die Spaltprodukte werden in 1 ml Petroläther gelöst in die Säulen gebracht und mit 30 bis höchstens 50 ml einer 2%igen Lösung von Äther in Petroläther die Fettsäuremethylester, mit weiteren 50 ml Chloroform die anderen Spaltprodukte eluiert.

Gaschromatographische Untersuchung der Fettsäuremethylester

Zur Ermittlung der Zusammensetzung der Fettsäuregemische wurden die gereinigten Methylesterfraktionen in einem Zentrifugenglas mit spitzem Boden eingedampft. Um alle Substanzen auf den Gefäßboden zu bringen und damit zum Schutz vor oxydativen Veränderungen die Oberfläche derselben zu verkleinern, wurde die gesamte Röhrcheninnenwand mit etwa 3 Tropfen Aceton oder Chloroform benetzt und die verschlossenen Gläser kurze Zeit zentrifugiert. Aliquote Teile dieser Lösung wurden mit Hilfe einer Mikroinjektionspritze (Fa. Hamilton, Wittier/USA) in den Gaschromatographen eingeführt.

Für die Untersuchungen stand ein Geräß der Fa. Packard Instruments (La Grange/USA) zur Verfügung, das mit einem Argondetektor ausgerüstet war. Dabei betrug die Temperatur der Trennsäule 195°C , die des Probenverdampfers $270\text{--}280^{\circ}\text{C}$ und die des Detektors 210°C . Die Strömungsge-

schwindigkeit des Trägergases (Argon) wurde bei einem Druckabfall längs der Säule von 1,5 - 1,7 kg/cm² auf etwa 100-120 ml/Min eingestellt. Die Trennsäulen hatten eine Länge von 1,8 m und einen Innendurchmesser von 0,4 - 0,6 cm. Als Säulenfüllung diente Chromosorb 80-100 mesh (Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co., Überlingen), das in 20%iger Belegung mit Bernsteinsäureäthylenglykollpolyester als stationäre Phase imprägniert war. Der Polyester war nach Angaben von Craig u. Murty (65) synthetisiert worden. Der Ionisationsdetektor des Gaschromatographen wurde bei einer Spannung von 500 V betrieben.

Anschließend wurden die Fettsäuremethylester hydriert und dann noch einmal gaschromatographisch untersucht. Dieses wurde als notwendig angesehen, um bei der quantitativen Auswertung der Gaschromatogramme die Fehlermöglichkeiten zu verringern (s. Eberhagen (64)). Bei der Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung wurde nach den Angaben von Eberhagen u. Plette (36) vorgegangen.

Reagentien

Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen p.a.-Qualität. Petroläther Kp. 50-70°C wurde von der Firma Riedel de Haen (Seelze b. Hannover), Kieselgel Mallinckrodt von der Firma Serva (Heidelberg), Pallidum-Hydrierkatalysator von der Fa. Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck (Darmstadt).

ERGEBNISSE

Jeweils 0,5 ml einer 4%igen Formalinlösung wurden den Ratten intraperitoneal injiziert. Die i.p. Applikationsweise wurde wegen der raschen Resorption des zugeführten Stoffes im Peritonealraum gewählt, die bei wässrigen Lösungen fast einer i.v.-Injektion entspricht. Nach 2, 6, 12, 24, 48 Stunden wurden jeweils 6 Ratten getötet, und Nebenniere und Blutserum entnommen.

8 Tiere starben bereits 10 bis 20 Minuten nach der Injektion, 4 Tiere nach 24-48 Stunden. Bei diesen beiden Zeitgruppen wurden nur die Nebennieren entnommen. Die Nebennieren jeder Zeitgruppe mußten wegen der geringen Substanzmengen gemeinsam aufgearbeitet werden. Die Kontrolltiere erhielten 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung und wurden 2 Stunden p.i. geschlachtet.

Auf die Injektion hin kam es bei den Tieren zu folgenden Reaktionen. Die 2-Stunden-Tiere waren stark benommen, zeigten struppiges Fell und nur geringe Agitation. Bei den 6-Stunden-Tieren fand man nach Eröffnung der Bauchhöhle geringes seröses Transsudat und eine leichte Hyperämie der Bauchgefäße. In ihrem Verhalten zeigten sie eine etwas größere Agitation, als es 2 Stunden nach der Injektion der Fall war. 12 Stunden nach der Formalininjektion hatte sich die Hyperämie der Mesenterialgefäße verstärkt; in der Leibeshöhle fand man reichlich seröses klares, leicht gelb gefärbtes Transsudat. 24 Stunden nach der Injektion war das Exsudat unverändert, die Gefäße hatten sich jetzt stark schwarz-rot verfärbt. Der Inhalt der Darmschlingen schimmerte schwärzlich durch die Darmwand. Die Darmschlingen lösten sich zum Teil von selbst vom Mesenterium. Das retroperitoneale und das Fett des

großen Netzes war nur noch in geringen Mengen vorhanden. Die Nebennieren waren schlaff und schlecht zu präparieren. Bei den zu diesem Zeitpunkt getöteten Tieren konnte nur wenig Blut erhalten werden. Die Tiere, die 24-48 p.i. starben, hatten starke Fibrinauflagerung auf allen serösen Häuten. Die Tiere der 48-Stunden-Gruppe zeigten nur noch geringes Transsudat im Bauchraum, die Gefäßinjektion war zurückgegangen und nur bei manchen Tieren fand man noch stellenweise eine geringe Fibrinauflagerung. Das zirkulierende Blutvolumen hatte wieder derart zugenommen, daß normale Serumengen gewonnen werden konnten.

Tabelle 1: Die Zusammensetzung der Nebennieren nach i.p.-Injektion
von 0,5 ml 4%iger Formalinlösung

Zeit nach der Injektion	Kontroll- gruppe	10-20 min ⁺	2 Stdn	6 Stdn	12 Stdn	24 Stdn	24-48 Stdn ⁺	48 Stdn
Zahl der Tiere	5	8	6	6	6	6	4	6
Durchschnittliches Körpergewicht (g)	251	189	206	197	202	226	180	204
Organfrischgewicht (mg)	264	323	300	284	287	363	282	289
Organtrockengewicht (mg)	78,4	84,1	83,5	75,1	74,0	87,3	66,5	73,8
Extrahierter Geweberückstand (mg)	35,4	42,1	42,7	37,1	40,6	49,4	35,1	47,8
DNS-Gehalt (%)	3,27	2,26	1,41	1,37	1,41	2,13	1,25	1,65
Wasserlösliche Extraktstoffe ⁺ (mg)	12,4	14,2	12,1	4,3	7,7	12,5	11,3	12,2
Gesamtlipide ⁺⁺ (mg)	30,6	27,7	28,7	33,7	26,7	25,4	20,1	23,8
Phosphorgehalt (%)	1,32	1,45	1,55	1,29	1,74	2,2	1,85	2,18
Cholesterinestergehalt (%)	47,4	46,2	30,3	42,3	18,5	13,6	11,6	28,4
davon Cholesterinester I (%)	30,9	39,5	25,7	36,4	13,3	7,2	8,7	21,6
Cholesterinester II (%)	16,5	6,8	4,6	5,8	5,2	6,4	2,9	6,8
Gehalt an freiem Cholesterin (%)	1,6	1,8	3,7	2,4	2,4	3,3	3,3	3,1

⁺ Als wasserlösliche Extraktstoffe ist der Verdampfungsrückstand der oberen Phase bei der Verteilung nach Folch bezeichnet.

⁺⁺ Als Gesamtlipide ist der Verdampfungsrückstand der unteren Phase bei der Folch-Verteilung bezeichnet.

Die Ergebnisse der Organuntersuchung sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Betrachtet man das Organfrischgewicht, so sieht man, daß es im Vergleich zu den Kontrolltieren von 0,21% (bezogen auf das Körpergewicht) ständig anstieg bis auf 0,27% beim 24-Stundenwert und bei den zwischen 24 und 48 Stunden gestorbenen Tieren seinen Höhepunkt mit 0,39% erreichte; beim 48-Stundenwert fiel es wieder auf 0,24%, erreichte jedoch nicht den Ausgangswert. Dieses Verhalten war, wie die Abb. 1 zeigt, auf den Einstrom von Wasser in das Organ zurückzuführen. Der DNS-Gehalt stieg als Zeichen der Organstimulierung während der ersten beiden Stunden von 1,48% des Trockengewichtes auf 1,7% an. Der anschließende fortlaufende Abfall bis 24 Stunden nach der Formalingabe läßt sich vielleicht im Sinne eines Zelluntergangs infolge der Giftwirkung deuten.

Der Gesamtlipoidgehalt bezogen auf das Trockengewicht der Nebennieren zeigte zu Beginn der Beobachtungszeit keine eindeutigen Veränderungen. Es kam nach einer vorübergehenden Verminderung beim 2-Stundenwert zu einem Anstieg auf den höchsten, während des ganzen Versuchs ermittelten Wert 6 Stunden p.i., um dann wieder stark abzufallen. Er erreichte beim 24-Stundenwert sein Minimum und stieg dann wieder langsam an. Ähnlich verhielt sich der Quotient Gesamtlipoidextrahierter Geweberückstand. Er fiel während der ersten 2 Stunden von 0,86 auf 0,67 und stieg dann wieder auf 0,9 beim 6-Stundenwert an, sank anschließend bis auf 0,51 beim 24-Stundenwert und stieg dann wieder langsam an.

Die Änderungen des Gesamtlipoidgehaltes während der Beobachtungszeit ließen sich auf die entsprechend ausgeprägten Änderungen der Cholesterinester zurückführen. Hier folgte eine Verminderung der Cholesterinester

während der ersten 2 Stunden nach der Vergiftung um ca. $\frac{1}{3}$ des Ausgangswertes beim 6-Stundenwert eine Wiederauffüllung der Organe mit diesen Verbindungen auf den Anfangswert. Dann aber kam es zu einer fast völligen Entspeicherung, die 24 Stunden p.i. mit etwa nur einem Fünftel des Ausgangsgehaltes maximal war. Ebenso wie in dem Rückgang der Krankheitszeichen drückte sich 48 Stunden nach Versuchsbeginn die Wiedererholung der Tiere in einer beginnenden Cholesterinestereinlagerung in die Nebenniere aus. Bei den Phosphatiden kam es als Folge der Intoxikation zu einer anhaltenden, wenn auch vergleichsweise nur geringen Vermehrung von 13 auf 17% des Organtrockengewichtes. Die Triglyceride stiegen ebenfalls während der ersten 12 Stunden fortlaufend an, fielen dann aber im Verlauf der weiteren Beobachtungszeit stark ab (s. Tab. 2).

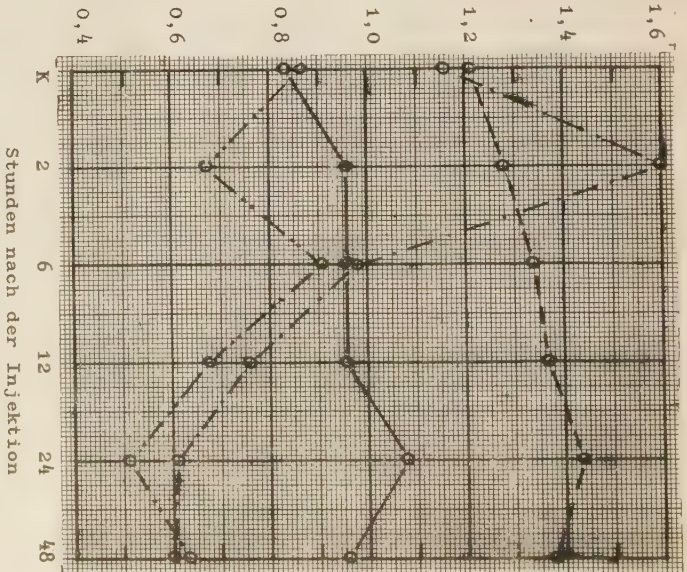
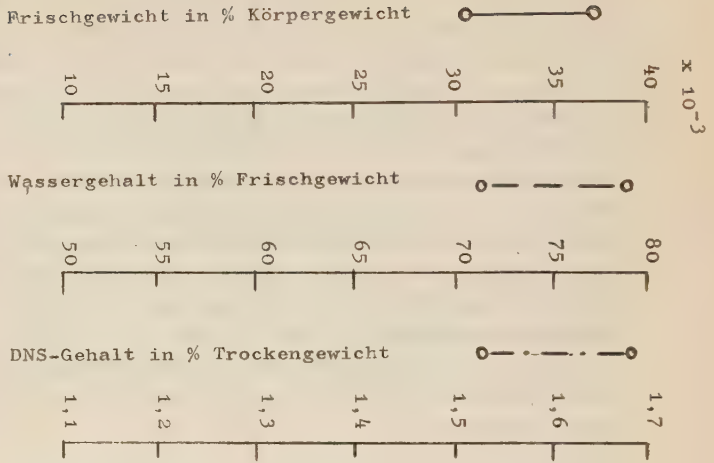


Abb. 1 Das Frischgewicht der Nebennieren bezogen auf das Körpergewicht $\text{---}\circ\text{---}$, der Wassergehalt der Organe bei Bezug auf Frischgewicht $\text{---}\circ\text{---}$, der DNS-Gehalt des Trockengewichtes $\text{---}\circ\text{---}$ und der Quotient Gesamt-lipoide / extrahierter Geweberückstand $\text{---}\circ\text{---}$

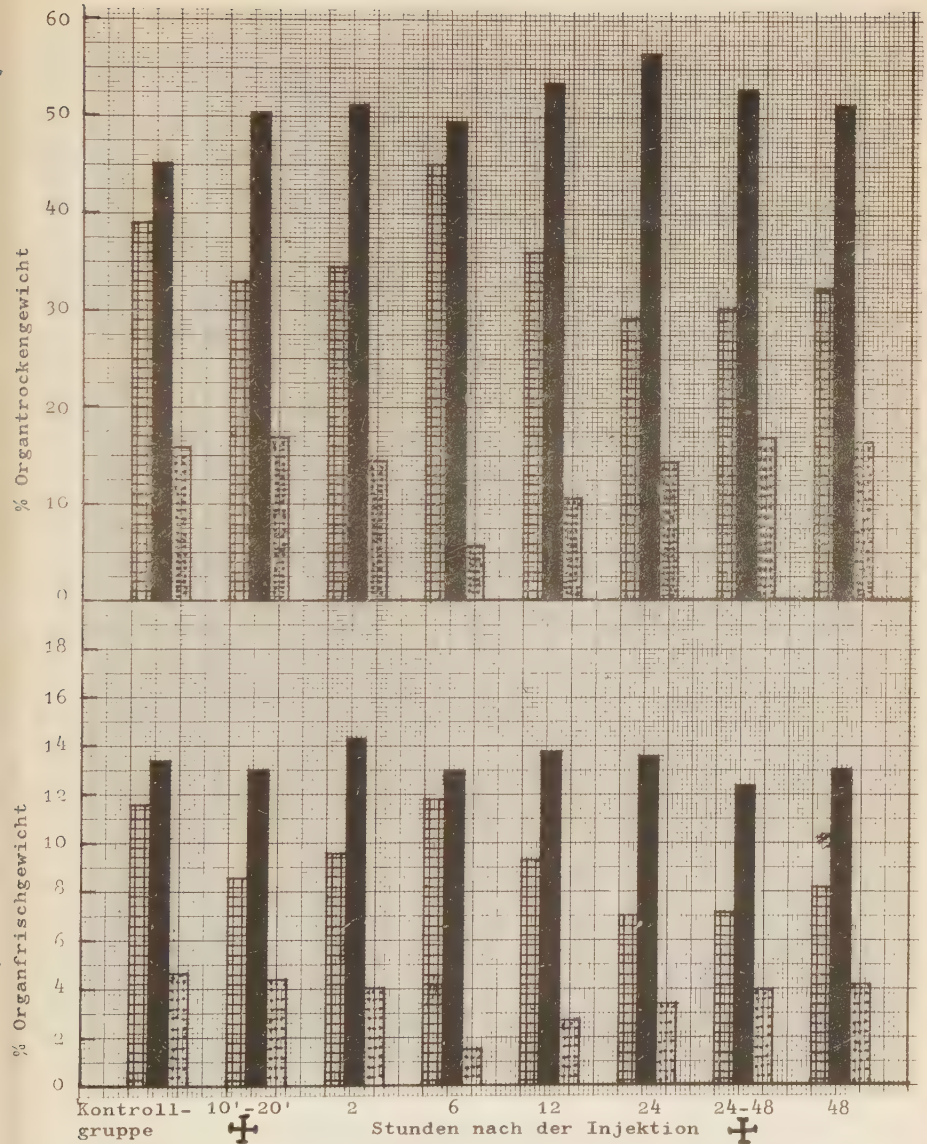


Abb. 2 Der Gehalt der Nebennieren an Gesamtlipoiden (schraffierte Säulen), extrahiertem Geweberückstand (schwarze Säulen) und wasserlöslichen Extraktstoffen (punktierte Säulen) in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p.-Injektion von 0,5 ml 4%iger Formalinlösung bezogen auf das Gesamttrockengewicht und das Frischgewicht.

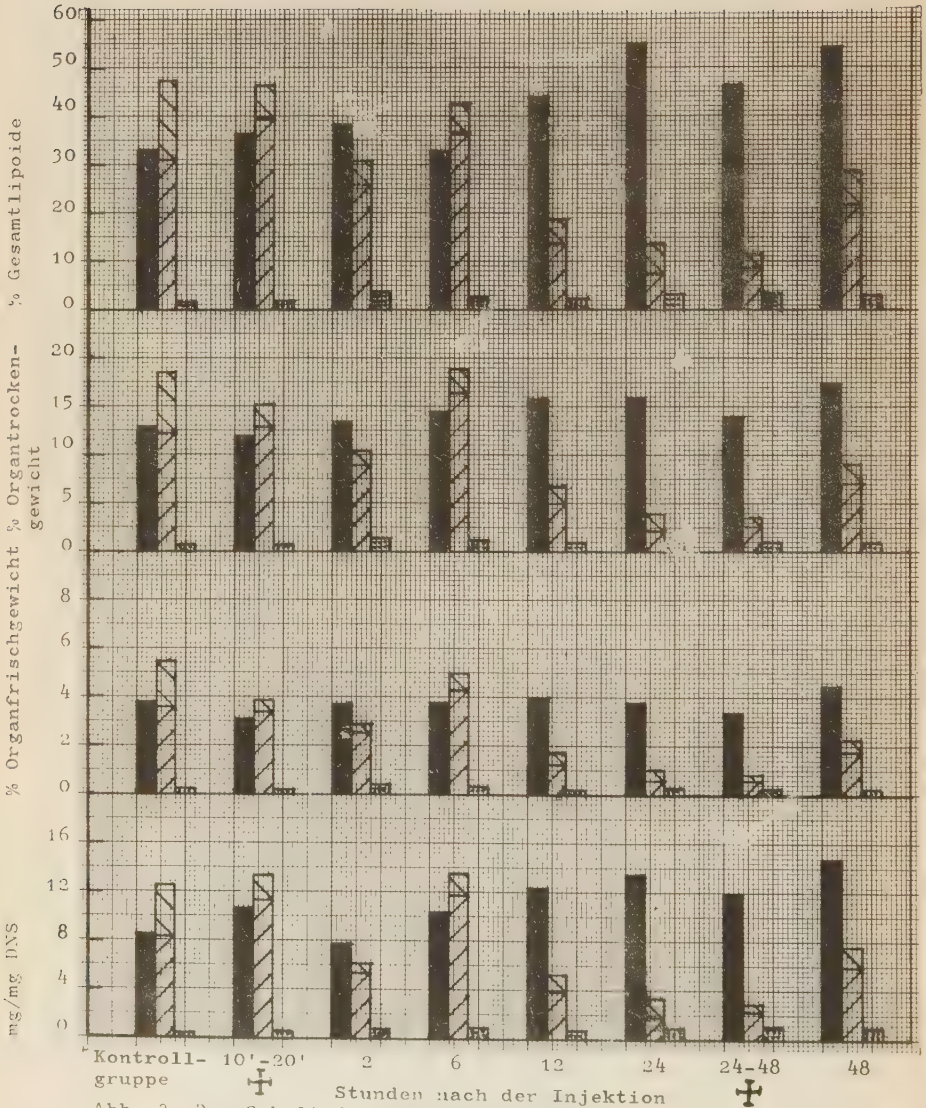


Abb. 3 Der Gehalt der Nebennieren an Phosphatiden (schwarze Säulen), Cholesterinestern (schräg schraffierte Säulen) und freiem Cholesterin (punktierte Säulen) bezogen auf Gesamtlipide, Trockengewicht, Frischgewicht und DNS-Gehalt. Bei den Cholesterinestern entspricht der untere Teil der Säulen (Schraffierung von rechts oben nach links unten) dem CE I-Gehalt, der obere (Schraffierung von links oben nach rechts unten) dem CE II-Gehalt.

Tabelle 2: Das Verhalten der Triglyceride während der Beobachtungszeit in % des Organgewichtes

K	10-20' ±	2	6	12	24	24-48 ±	48
7,0	5,2	9,4	10,3	12,7	8,1	11,7	4,6

Sie wurden aus der Differenz zwischen dem Gesamtlipoidgehalt und der Summe von Lipoidphosphorgehalt mal 25 plus Gehalt an freiem Cholesterin plus Gehalt an Estercholesterin mal 1,7 errechnet. Der Faktor 25 zur Umrechnung von Lipoidphosphor auf Phosphatide ergibt sich bekanntlich bei der Annahme eines P-Gehaltes reiner Phosphatide von 4%, der Faktor 1,7 zur Umrechnung von Estercholesterin auf Cholesterinester, wenn man ein mittleres Molekulargewicht der an das Cholesterin gebundenen Fettsäuren von 290 (Ölsäure/Arachidonsäure 1:1) zugrunde legt (66).

Tabelle 4: Das Verhalten der Lipide im Serum nach i.p. Injektion von 0,7 ml
4%iger Formalinlösung

Zeit nach der Injektion (Std.)	Kontroll- gruppe	2	6	12	24	48
Gesamtlipide (mg%)	352	251	293	346	359	337
Cholesterinester (mg%)	105,1	81,6	94,1	111,1	135,3	110,9
Freies Cholesterin (mg%)	14,1	10,7	13,2	26,6	19,4	11,5
Phosphatide (mg%)	106,3	75,3	95,2	112,4	116,7	101,1

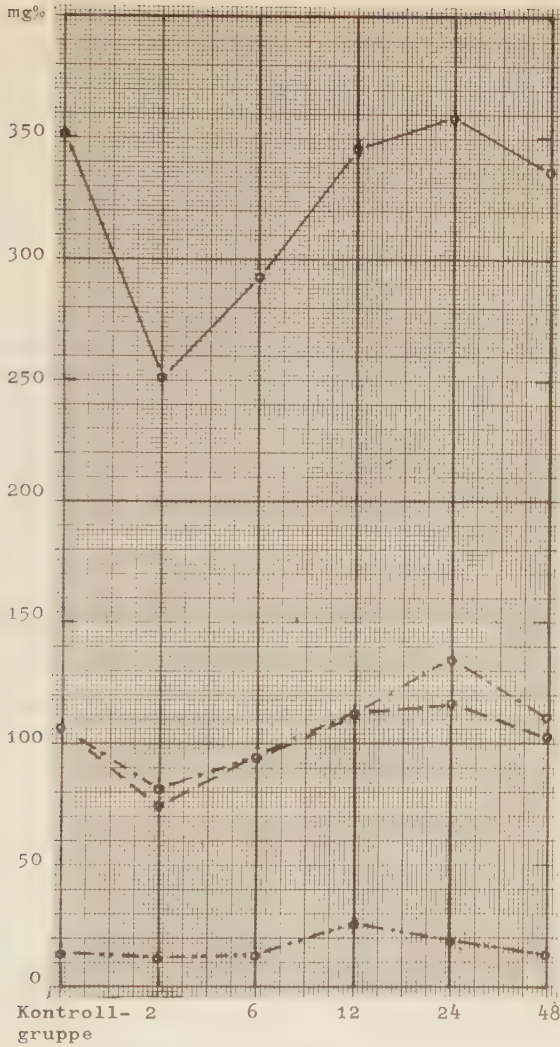


Abb. 4 Das Verhalten des Gesamtlipoid- (o o), Phosphatid- (o---o), Cholesterinester- (o---o-o) und Cholesterinspiegels (o---o) im Blutplasma

Die Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung in den drei Lipoidfraktionen erbrachte eine mäßige Anreicherung der Polyenfettsäuren, sowohl in den Phosphatiden, als auch in den Cholesterinestern (Abb. 5, Tab. 5). Bei den Phosphatiden kam es zu einem Anstieg des Arachidonsäuregehaltes, der nur beim 12-Stundenwert geringfügig wieder nachließ, jedoch beim 24-Stundenwert p.i. das Sechsfache des Ausgangswertes erreichte.

Auch bei den Tetraensäuren der Cholesterinester gab es ähnliche Verschiebungen, die jedoch nur bei der Docosatetraensäure sehr stark waren. Die Arachidonsäure zeigte nur einen mäßigen Anstieg bei den nach 10-20' ad exitum und bei den nach 24-48 Stunden ad exitum gekommenen einen starken Anstieg, bei den anderen war kein besonderer Anstieg bemerkbar, trotzdem die Cholesterinester sich beim 2, 12, und 24-Stundenwert merklich verringert hatten, ja 24 p.i. sogar nur noch 1/5 des Ausgangswertes betrugen.

Die Docosatetraensäure zeigte ihr Maximum mit dem 4-fachen Wert des Ausgangswertes beim 2-Stundenwert, sank dann ab und stieg wieder auf den 3-fachen Ausgangswert beim 12-Stundenwert, ihr Minimum hatte sie beim 24-Stundenwert mit 3/4 des Ausgangswertes, stieg dann jedoch wieder mäßig bis zum 48-Stundenwert an.

Die Fettsäurezusammensetzung der Cholesterinester in Tab. 5 und der Abb. 5 wurde unter der Berücksichtigung der jeweiligen Konzentrationsverhältnisse bei CE I und CE II aus Tab. 6 errechnet. Bemerkenswert ist der beachtliche Wert der Linolsäure beim 24-Stundenwert zu einem Zeitpunkt also, an welchem der Anteil der Arachidon- und Docosatetraensäure sein Minimum hat, ebenfalls auch der Cholesterinestergehalt.

Ein bei ähnlichen Versuchsserien (63) noch nicht beobachtetes Ereignis, ist daß der plötzliche Anstieg der Eikosatriensäure bei den Cholesterinestern bei den nach 10-20' Minuten und bei den nach 24-48 Stunden ad exitum gekommenen Tieren; dieses Ergebnis erfordert eine gesonderte Betrachtung und soll erst im Anschluß an die allgemeine Diskussion näher erörtert werden.

Die im Blutplasma ermittelten Lipoidwerte sind in Tab. 4 und Abb. 4 aufgeführt. Hierbei zeigt sich, daß die Gesamtlipoides von 350 mg% als Ausgangswert sofort beim 2-Stundenwert auf 250 mg% abgefallen waren, um dann ständig bis zum 24-Stundenwert auf 360 mg anzusteigen und beim 48-Stundenwert wieder auf der Ausgangsbasis anzukommen. Die Phosphatide zeigten einen parallelen Verlauf, jedoch ohne so außerordentliche Unterschiede aufzuweisen. Sie fielen von 106 mg% auf 75 mg% beim 2-Stundenwert und stiegen dann auf 116 mg beim 24-Stundenwert worauf sie sich wieder auf den ursprünglichen Spiegel einstellten. Denselben Verlauf zeigte der CE-Spiegel. Er erreichte ebenfalls mit dem 24-Stundenwert sein Maximum von 135,3 mg% und kehrte dann wieder auf den Ausgangswert zurück. Der freie Cholesteringehalt blieb ziemlich konstant bei 13% und zeigte nur nach 12 Stunden eine Erhöhung auf 25 mg%.

Abb. 5 Die gaschromatographisch ermittelte prozentuale Fettsäurezusammensetzung der Phosphatid-, Cholesterinester- und Triglyceridfraction. Die Zuordnung der einzelnen Säulen ergibt sich aus der Beschriftung.

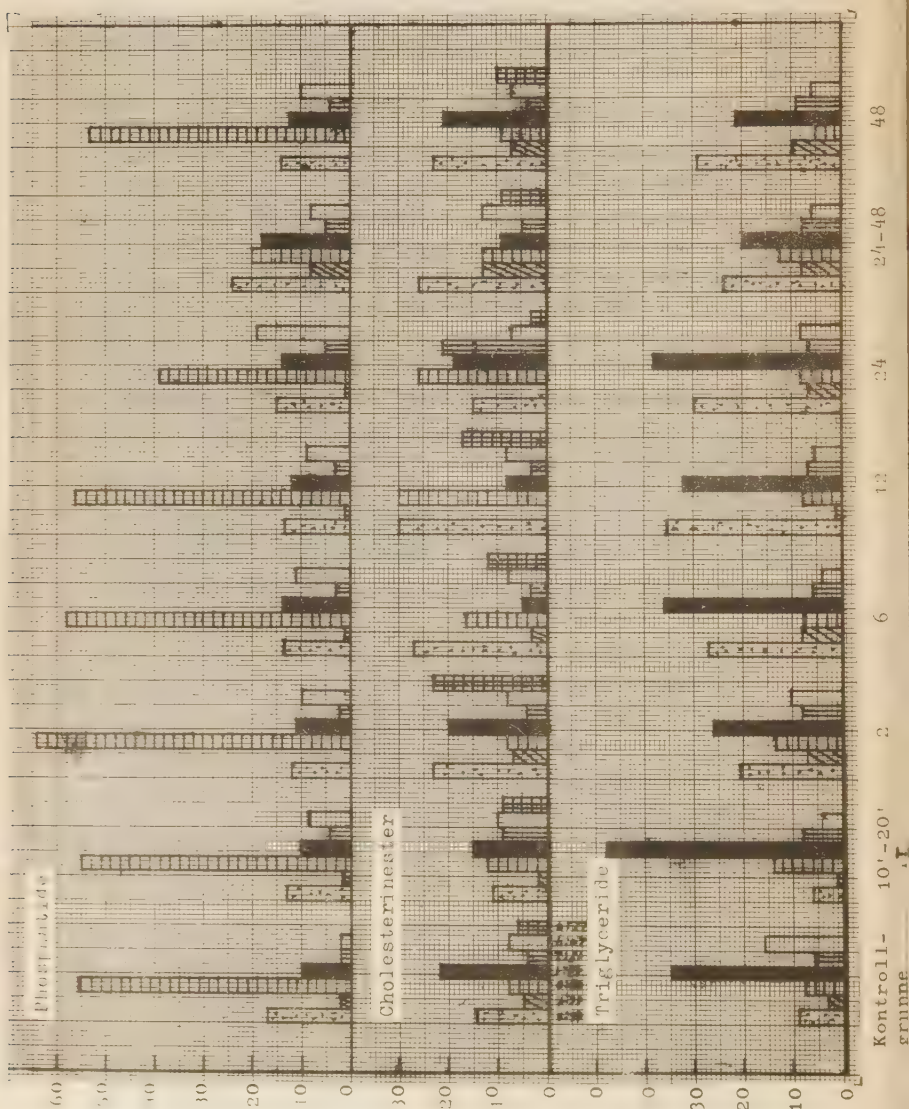


Tabelle 5: Prozentuale Zusammensetzung der Cholesterin-
esterfettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit
nach i.p. Injektion von 0,5 ccm 4%iger Forma-
linlösung

Fett- säuren	Kontroll- gruppe	Zeit nach der Injektion						
		10-20 ±	2	6	12	24	24-48 ±	48
12:0								
14:0	4,0	2,0	6,5	15,0	2,5			
16:0	14,5	11,0	23,0	27,0	30,0	15,0	26,0	23,0
16:1	4,5	1,0	6,5	2,5			12,5	7,0
16:2		2,0					4,5	
18:0	7,5	12,0	8,0	16,5	30,0	26,0	12,5	9,0
18:1	22,0	15,0	20,0	5,0	8,0	18,5	9,0	21,0
18:2	4,0	8,5	3,5	2,5	2,5	21,0	4,5	3,5
18:3	3,0							
20:0	3,0	16,0	1,5	2,5			8,5	3,5
20:1	1,0		1,5			6,0		2,0
20:2	7,5			2,5	2,5	3,0		2,0
20:3		8,5					8,5	
20:4	8,0	10,0	8,0	7,5	8,0	7,0	13,0	7,0
20:5								
22:0	3,0			6,0				
22:1	2,0	6,5	5,0	1,0	5,5	2,0	4,5	9,0
22:2								
22:3	2,0							2,0
22:4	6,0	8,5	23,0	12,0	16,5	2,5	8,5	10,5
22:5								

Tabelle 6: Prozentuale Zusammensetzung der Cholesterylsterfettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 cem 4%iger Formalinlösung

Fett- säuren	Kontroll- gruppe	CEI	CEII	H		Zeit nach der Injektion								H				48			
				10'-20'		2	6	12	24	24-48											
12:0																					
14:0	5,5			2,0		5,5	8,0	17,0	9,0	4,0											
16:0	10,5	19,5		10,0		22,5	13,5	29,5	16,5	24,5	40,0	14,0						21,0	29,0	21,0	30,5
16:1	3,5	5,5		1,0	7,0	6,0	8,0	1,0										8,5	12,0	5,5	13,0
16:2				2,0														8,0	3,0		
18:0	8,0	6,0		12,0		8,0	5,0	20,0	4,0	34,5	15,0	26,0						10,0	7,5	8,0	17,5
18:1	22,0	19,5		15,5		18,0	10,0	4,0	7,5	8,0	8,5	18,5						6,0	14,0	18,5	27,5
18:2	5,0	3,0		8,5		3,0	2,5	1,0	5,5	1,0	2,5	21,0						8,5	2,0	3,0	7,0
18:3	3,5	4,5																			
20:0	5,0			16,5	2,0	1,0	2,5	3,0	1,0		2,0							10,5	5,0	5,0	1,5
20:1		3,5				2,5	2,0			5,0	4,5	6,0								2,5	0,5
20:2	7,5	6,5						3,0				3,0								2,5	1,0
20:3				8,0														7,0			
20:4	3,0	8,0		9,5		7,0	12,0	7,0	10,0	6,5	4,0	7,0						7,0	12,5	5,5	2,0

Fortsetzung der Tabelle 6

Fett- säuren	Kontroll- gruppe		10-20'		2		6		12		24		24-48		48	
	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII	CEI	CEII
22:0	2,5	4,5														
22:1	2,0		6,5		5,5		6,5	7,5	7,0		2,0		1,5	5,5	12,0	
22:2													7,0			
22:3	1,5	4,0											1,5			
22:4	3,0	7,5	8,5		19,0	38,5	9,0	28,0	9,5	23,0	2,5		3,5	9,0	13,5	
24:0 ?																

Tabelle 7: Prozentuale Zusammensetzung der Phosphatid-
fettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit
nach i.p. Injektion von 0,5 ccm 4%iger
Formalinlösung

Fett- säuren	Kontroll- gruppe	Zeit nach der Injektion						
		10-20 ±	2	6	12	24	24-48 ±	48
12:0							1,0	
14:0	10,0	5,5	0,5	0,5	3,0	8,0	9,5	3,0
16:0	17,0	13,0	11,5	13,5	13,5	15,0	24,0	14,0
16:1	2,0	0,5		0,5	1,0	1,0	7,5	
18:0	55,5	55,0	64,5	58,0	56,5	39,0	20,0	53,5
18:1	10,0	10,0	11,0	13,5	12,0	13,5	18,0	12,5
18:2	2,0	4,0	2,0	2,5	0,5	4,5	2,5	4,0
18:3				0,5	3,0		5,5	
20:0		0,5		1,0	1,0			1,0
20:1	1,0	0,5		0,5	0,5		4,5	
20:2	1,0							1,0
20:3		0,5						
20:4	1,5	8,5	10,0	10,5	9,0	19,0	7,5	10,0
20:5								
22:0		1,5	1,0					
22:1								
22:2								
22:3								
22:4								
22:5								

Tabelle 8: Prozentuale Zusammensetzung der Triglyceridfettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 ccm 4%iger Formalinlösung

Fettsäuren	Kontrollgruppe	10'-20'	2	6	12	24	24-48	48
		⊕					⊕	
12:0								
14:0		16,5	3,0	4,5	4,0	3,0	8,5	16,0
16:0	9,0	5,5	20,5	27,0	35,5	29,5	23,5	29,0
16:1	3,0	1,0	7,0	8,0	1,0	6,5	8,0	9,5
16:2							3,0	
18:0	7,5	14,0	13,5	7,5	7,5	8,0	12,5	5,0
18:1	35,0	48,0	26,0	36,0	32,0	38,0	20,0	21,5
18:2	5,5	7,5	8,0	6,0	6,5	6,5	7,5	9,0
18:3	3,0	2,0						
20:0	6,0			1,0	1,0			2,5
20:1	9,5	1,5	2,0	1,0	1,5	1,0	5,5	
20:2	4,0							
20:3								2,5
20:4	16,5	4,0	10,5	4,0	5,5	8,0	6,0	5,5
20:5								
22:0								
22:1								
22:2								
22:3			9,5	2,0	6,5		5,5	
22:4								
22:5								

DISKUSSION

Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren, sowie des freien Cholesterins

Der Cholesterinestergehalt der Nebennieren steht wie der Ascorbinsäuregehalt in direkter Beziehung zur Corticoidproduktion bzw. Sekretion, kann also geradezu als Indikator der Organaktivität dienen und ist dementsprechend außerordentlichen Schwankungen unterworfen (17, 18, 19, 34, 67). Im nichtstimulierten Organ der Ratte lag beim vorliegenden Versuch der Cholesterinestergehalt bei 18,5% der Trockensubstanz bzw. 5,5% des Frischgewichts. Diese Werte sind gegenüber Untersuchungen von Eberhagen (63) in denen der Gehalt auf 12% bzw. 4% lag, etwas erhöht. Die Cholesterinmengen waren fast ausschließlich in Form der Ester im Gewebe abgelagert, da der Gehalt des freien Cholesterins nur 1 bzw. 0,2% der Trockensubstanz bzw. des Frischgewichtes betrug.

Wie erstmals der Arbeitskreis um Hechter (25, 26) gezeigt hat, kann das Cholesterin der Nebenniere zum Aufbau der Steroidhormone verwendet werden, so daß die Annahme nahe liegt, daß das Organ sich gewissermaßen dadurch ein Depot an Stoffwechselvorläufern anlegt, um im Bedarfsfall rascher die Corticoidsekretion erfolgen zu lassen. Diese Auffassung steht im Gegensatz zu den Vermutungen von Cushman u. Mitarb. (68), die an eine einzeitige Totalsynthese der Steroidhormone direkt aus Acetyl-CoA glauben. Da aber der Cholesterinestergehalt, wie vorangegangene Untersuchungen von Eberhagen (63) zeigten, nach verschiedenen Stimulierungen der Nebennieren abnahm, scheint es doch so zu sein, daß in erster Linie das in Esterform vorliegende Cholesterin zur Synthese der Corticoide verwendet wird.

Betrachtet man den zeitlichen Ablauf der Cholesterinentleerung des Organs, so ergab sich eine ständige Entspeicherung an den Cholesterinestern, sieht man vom vorübergehenden Anstieg beim 6-Stundenwert ab, die ihr Maximum mit $1/4$ des Ausgangswertes 1 Tag nach Versuchsbeginn erreichte. Dieser Verlust machte sich schon bei den nach 10-20 Minuten gestorbenen Tieren bemerkbar. Bei den Untersuchungen von Eberhagen (63) waren die Organe schon 6-12 Stunden nach der Stimulierung maximal an Lipoiden verarmt; bei den vorliegenden ist diese Verschiebung wahrscheinlich auf die besonders starke Belastung des Organismus oder auf eine direkte Giftwirkung auf die Nebenniere zurückzuführen. Beim 48-Stundenwert war es dann wieder zu einer merklichen Speicherung mit CE gekommen.

Die Zusammensetzung der Cholesterinfettsäuren zeigte einen in keinem anderen Organ vorher beobachteten Anstieg der Tetraensäuren, wobei die Docosatetraensäure größeren Schwankungen unterworfen war als die Eikosatetraensäure. Der C_{22} -Tetraensäure-Wert nahm nach 2 Stunden um das 4-fache zu und beim 12-Stunden-Wert wurde das 3-fache des Ausgangswertes beobachtet, während die Arachidonsäure nur eine geringe Vermehrung aufwies. Wahrscheinlich handelte es sich bei beiden - wie bei der Docosatetraensäure aus Rinder- (46) und Hundenebennieren (69) sichergestellt - um Linolsäureabkömmlinge, so daß man annehmen kann, daß die C_{22} -Tetraensäure aus der Arachidonsäure hervorgegangen ist.

Besonders von Hikasa u. Mitarb. (31) wird das Cholesterin-arachidonat als Stoffwechselvorläufer der Corticoidhormone angesehen. Nach Eberhagen (63) und den vorliegenden Ergebnissen könnten jedoch die mit Docosatetraensäure veresterten Cholesterinester in dieser Hinsicht eine

größere Bedeutung haben, denn in dem nach diesem Stress erfolgenden Umbau der Fettsäurezusammensetzung nahmen sie den größten Teil ein.

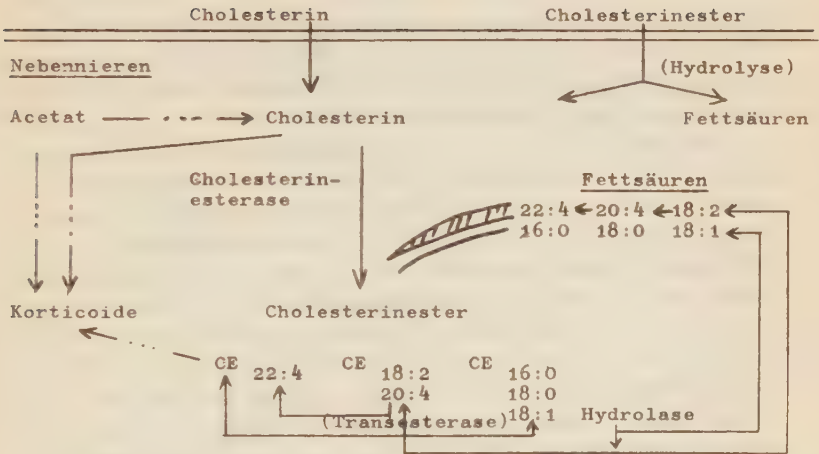
Fukuda (70) hatte bei seinen Untersuchungen 2 Stunden nach einem Stress in den Nebennieren einen maximalen Corticosterongehalt festgestellt, der danach ständig abnahm. Bei den vorliegenden Untersuchungen ergab sich zu diesem Termin ein maximaler Gehalt an Docosatetraensäure in den Nebennieren-Cholesterinestern. Eine Beziehung zwischen Corticoidsynthese und den Docosatetraensäurecholesterinestern liegt demnach nahe. Eine direkte Proportionalität ist jedoch zwischen beiden nicht wahrscheinlich, da die Cholesterinester nach der Hypothese nur speicherförmige Durchgangsstoffe darstellen würden, während die Corticoide ja die Endprodukte des komplexen Stoffwechselgeschehens sind.

Der Anstieg der Cholesterinester in dem Organ beim 48-Stunden-Wert brachte auch wieder ein ähnliches Fettsäuremuster wie bei den Kontrolltieren: die Lipoidspeicherung begann, was auch der Lehre von Selye entspricht.

Zur Diskussion um die Möglichkeiten bei der Regulation der Cholesterinesterkonzentration und -zusammensetzung in der Nebenniere soll folgendes Schema dienen, das Eberhagen entnommen wurde (63).

Schema 1

Blutbahn



Von Sere u. Mitarb, (20) ist erstmals die Fähigkeit des Organs zum Aufbau des Cholesterins aus Acetat beschrieben worden. Neben dieser endogenen Bildung kann das Cholesterin auch aus der Blutbahn stammen; darauf kann jedoch nicht näher eingegangen werden, da die dazu notwendigen Untersuchungen nicht gemacht wurden. Exogene Cholesterinester werden infolge der hohen Hydrolyseaktivität des Organs (71) jedenfalls rasch zu freiem Cholesterin und den Fettsäuren gespalten. Die organeigenen Cholesterinester werden wahrscheinlich aus dem im Organ vorhandenen Cholesterinpool aufgebaut, wobei eine wie in der Leber in den Mikrosomen und Mitochondrien lokalisierte Cholesterinesterase (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) (72) den

Vorgang katalysiert. Ob sofort infolge der Spezifität der Cholesterinesterase die organcharakteristischen Cholesterinester mit ihrem hohen Gehalt an C_{20} - und C_{22} -Tetraensäuren gebildet werden, ist nicht sicher. Dafür müßte die Enzymspezifität außergewöhnlich groß sein.

Wie bereits vorher erwähnt, fand sich in den nach 10-20 Minuten und 24-48 Stunden ad exitum gekommenen Tiergruppen eine bemerkenswert hohe Eikosatriensäurekonzentration, wie sie in früheren Untersuchungen von Eberhagen u. Zöllner (35) nur in Nebennierencholesterinestern von histologisch als regelrecht beurteilten menschlichen Autopsieorganen gefunden wurden. In der Kontrolltiergruppe ließen sich in den Cholesterinestern demgegenüber kaum erfaßbare Eikosatriensäuremengen nachweisen. Die betreffende Bande in dem Gaschromatogramm der 10-20 Minuten p.i. gestorbenen Ratten besaß eine Kohlenstoffzahl von 21,4. Nach den von Gidez (73) ermittelten Retentionszeiten für die C_{20} -Triensäure-Isomeren sollte es sich hier um den Ölsäureabkömmling mit der Lokalisation der Doppelbindungen in Stellung $\Delta 5, 8, 11$ handeln, der immer bei Mangel an frei verfügbarer Linol- oder Arachidonsäure auftritt. Die C-Zahl der entsprechenden Bande bei den einen bis zwei Tage nach der Vergiftung gestorbenen Tieren dagegen weist auf die Homo- γ -linolensäure mit der Struktur $\Delta 8, 11, 14$ -Eikosatriensäure hin, die durch Dehydrierung und Kettenverlängerung aus der Linolsäure entsteht und deren Vorhandensein in größeren Konzentrationen in den Cholesterinestern der Kaninchennebenniere nach Fütterung der Tiere mit linolsäurereicher Diät von Moore u. Williams (74) kürzlich wahrscheinlich gemacht wurde.

Geht man wieder von der Vorstellung von Hikasa u. Mitarb. (31) aus, wonach irgendwie eine Beteiligung der Arachidon-

säure bzw. Dokasatetraensäure bei der Umwandlung des Cholesterins zu den Corticoidhormonen angenommen werden kann, so kam es im vorliegenden Fall infolge der hohen Organaktivität unmittelbar nach dem hier erzeugten Stress zu einer akut gesteigerten Cortikoidproduktion, die zu einem nicht zu deckenden Bedarf an Arachidonsäure in den Organen und damit zu einem Eikosatriensäure-Eikosatetraensäure-Quotienten der Cholesterinester von 0,85 führte. Dieser Mangel wird auch dadurch glaubhaft, daß der Antransport der Arachidonsäure via Blutbahn sich infolge des Abfalls der Serumgesamtlipoide von 352 mg% bei den Kontrolltieren auf 251 mg% bei den 2 Stunden nach der Vergiftung untersuchten Tieren (Phosphatide von 106 auf 75 mg%, Cholesterinester von 105 auf 81 mg%) verringerte. Im weiteren Verlauf der Beobachtungszeit stiegen die Gesamtlipoide im Blut, in erster Linie die Cholesterinester und die Phosphatide, wieder bis zum Maximum beim 24-Stunden-Wert an. Jetzt lag der Serumspiegel dieser Verbindungen sogar geringfügig über dem der Kontrolltiere (Gesamtlipoide 350 mg%, Cholesterinester 135 mg%, Phosphatide 117 mg%). Damit war das Angebot an den essentiellen Polyenfettsäuren an die Nebennieren wieder ausreichend. Der bei den 24-49 Stunden p.i. verendeten Ratten ermittelte C_{20} -Triensäure-Tetraensäure-Quotient von 0,65 wäre jetzt also nicht Ausdruck für einen Linol- und Arachidonsäuremangel, sondern Zeichen einer verstärkten Bildung von Arachidonsäure aus Linolsäure. In diesem Sinne spricht auch der überraschend hohe Linolsäuregehalt der 24-Stunden-Gruppe.

Das Verhalten der Phosphatide und ihrer Fettsäuren

Beobachtungen von Eberhagen (63) hatten gezeigt, daß der Gehalt der Phosphatide in den Rattennebnieren durchschnittlich bei 10,5% der Trockensubstanz bzw. 3,7% des

Frischgewichtes lag, also in ähnlicher Höhe wie in der Leber (75) und in der Niere (54). Bei den vorliegenden Untersuchungen ergab sich ein Phosphatidgehalt von 12,9% der Trockensubstanz, bzw. 3,8% des Frischgewichtes bei den Kontrolltieren, Werte die die oben genannten Ergebnisse bestätigen. Die Mehrzahl der Phosphatide wird hier, ebenso wie in anderen Organen, vor allem in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum als integrierte Membranbestandteile strukturgebunden sein. Ihr Gehalt im Gewebe unterliegt dann den gleichen Schwankungen, den die subzellulären Partikel durch Neubildung und Wiederabbau, durch Vergrößerung und Verkleinerung zeigen. Kommt es also beispielsweise als Folge einer Organstimulierung zu einer Zunahme und Beschleunigung von Stoffwechselvorgängen und dementsprechend zu einem vermehrten Bedarf an Energieträgern, so erfolgt in relativ kurzer Zeit eine Vermehrung der Mitochondrien und eine Verdichtung des endoplasmatischen Retikulums (76), in chemischer Hinsicht würde aus diesen Vorgängen eine Erhöhung des Phosphatidgehaltes resultieren.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein solcher Anstieg der Phosphatide beobachtet. So erfolgte eine Vermehrung von 12,9% der Trockensubstanz auf 14,5% beim 6-Stunden-Wert, auf 15,7% beim 12-Stunden-Wert, auf 16,0% beim 24-Stunden-Wert und weiter auf 17,5% beim 48-Stunden-Wert. Dieser fortlaufende Anstieg des Phosphatids ist wahrscheinlich auf die übermäßige Belastung des Organismus durch die hohe Formalindosierung zurückzuführen. Bei einem analogen Versuch mit der halben Formalinmenge hatte Eberhagen 2 Tage nach Versuchsbeginn bereits eine Rückbildung des ebenfalls primär angestiegenen Phosphatidgehaltes auf den Ausgangswert festgestellt (63).

Von entscheidender Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der Phosphatide scheint der Gehalt der glycerinhaltigen Phosphatide an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu sein. Alle zur Zeit vorliegenden Tatsachen sprechen dafür, daß diese Phosphatide erst dann bei chemischen Umsetzungen voll wirksam werden, wenn sie β -ständig eine Polyenfettsäure enthalten. Wenn man dies berücksichtigt und eine irgendwie geartete Beteiligung der Phosphatide an der Corticoidsynthese annimmt, dann verdient der Arachidonsäuregehalt der Phosphatide besondere Aufmerksamkeit. Bei den Kontrolltieren lag er nur bei 2%, also sehr niedrig, und das unterstützt die Annahme daß es sich bei diesen Organen um Ruheorgane gehandelt hat. Mit dem Anlauf der Corticoidsynthese und -sekretion fand sich ein immer höherer Prozentsatz an Arachidonsäure in den Phosphatiden, der 24 Stunden nach der Organstimulierung mit 19% seinen Höhepunkt erreichte.

Diese Arachidonsäureanreicherung läßt sich vielleicht mit der Annahme eines Membranaufbaus in der Zelle erklären, der sich in Abhängigkeit vom Funktionszustand des Organs ändert (63). Zur Aufrechterhaltung von stoffwechselmäßig inaktiven Ruhestrukturen dürften nach allen bisher vorliegenden Informationen Phosphatide ohne Polyenfettsäuren durchaus in der Lage sein. Sollen diese Membranen dann aber beim Anlaufen bestimmter Stoffwechselsvorgänge an der Durchführung biochemischer Umsetzungen beteiligt werden, so ist das nur möglich, wenn ihre Phosphatide neben einer gesättigten Fettsäure eine mehrfach ungesättigte im Molekülverband besitzen. Als solche kommt hier anscheinend nur die Linolsäure oder die aus ihr gebildete Arachidonsäure in Frage.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine starke Zunahme von arachidonsäurehaltigen Phosphatiden, deren Bildung

als die Antwort auf die starke Stimulierung des Organs anzusehen ist, wobei das Maximum bei 24 Stunden lag. Anschließend kam es dann zu einer markanten Abnahme des Arachidonsäuregehaltes. Aus dieser Tatsache kann man ableiten, daß sich trotz der besonders starken Organaktivierung mit Formalin zu diesem Zeitpunkt bereits wieder die Ruhestuktur der Phosphatide auszubilden begann.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ratten wurden mit einer intraperitonealen Formalininjektion (0,5 ml 4%ige Lösung) behandelt und die Lipoidzusammensetzung der zu verschiedenen Zeiten nach dieser Behandlung entnommenen Nebennieren untersucht. 10-20 Minuten nach der Injektion und 24-48 Stunden nach der Injektion starb ein Teil der Tiere. Die Lipide wurden durch eine kombinierte säulen-dünnschichtchromatographische Technik, ihre Fettsäuren gaschromatographisch getrennt.
2. Der Phosphatidgehalt der Nebennieren lag bei den Kontrolltieren bei 12,8% der Trockensubstanz, bzw. 3,8% des Frischgewichts und nahm nach Stimulierung der Organaktivität 2 Tage lang bis zu 17% der Trockensubstanz zu. Die Fettsäurezusammensetzung der Phosphatide änderte sich durch das Verhalten der Arachidonsäure charakteristisch. Der Arachidonsäuregehalt stieg von 3% bei den Kontrolltieren auf 19% in den 24 Stunden nach der Stimulierung untersuchten Nebennieren an. Danach fiel er wieder ab.
3. Die Cholesterinester der Nebennieren sind durch einen hohen Gehalt an Arachidonsäure und Docosatetraensäure

ausgezeichnet. Ihr Gehalt im Organ lag bei den Kontrolltieren bei 18,5% der Trockensubstanz, bzw. 5,5% des Frischgewichtes. Im Verlauf der Stressreaktion nahm er bis 3,5% der Trockensubstanz bei den nach 24-48 Stunden gestorbenen Tieren ab, danach erfolgte wieder ihre Speicherung in den Organen. Sehr bemerkenswert war als Folge der Vergiftung die Anreicherung der Eikosatriensäure in den verendeten Tieren, die zu einem C_{20} -Triensäure/ C_{20} -Tetraensäure-Quotienten führte, wie er sich sonst nur bei Ernährung mit einer zum Mangel an essentiellen Fettsäuren führenden Kost findet.

Die Frage, ob das Cholesterin vor seiner Umsetzung zu den Corticoidhormonen zuerst durch Veresterung mit Arachidonsäure bzw. Docosatetraensäure aktiviert werden muß, konnte aus den Veränderungen der Cholesterinesterfettsäuren nicht eindeutig beantwortet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Bourne, G.H.: Ciba Found.Colloq.Endocrin. 8, 1 (1955)
- (2) Virchow, R.: Virchows Arch.path.Anat. 12, 481 (1957)
- (3) Rosenheim, O., u.M.C.Tebb: J.Physiol. (London) 38, Proc.Liv. (1909)
- (4) Borberg, N.C.: Skand.Arch.Physiol. 32, 287 (1915)
- (5) Ault, W.C., u.J.B.Brown: J.Biol.Chem. 107, 607 (1934)
- (6) Bernard, L., u.Bigart: Compt.rends.soc.biol. (Paris) 54, 1400 (1902)- zit. nach Wolman (9)
- (7) Bardier u. Bonne: Compt.rends.biol. (Paris) 55, 355 (1903)- zit. n. Wolman (9)
- (8) Goormaghtigh, N., u. L.Elaut: Compt.rends.soc.biol. (Paris) 92, 733 (1925)
- (9) Wolman, M.: Lipids II, Histochemistry of Lipids in Pathology S.316 ff. In: Handbuch der Histochemie, herausgegeben von W.Graumann u. K.H.Neumann. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1964
- (10) Selye, H.: Nature (London) 138, 32 (1936)
- (11) Selye, H.: Brit.J.exp.Path. 17, 234 (1936)
- (12) Selye, H.: Endocrinology 21, 169 (1937)
- (13) Mulon, P.: Compt.rends.Soc.Biol. (Paris) 75, 189 (1913)
- (14) Pickard, E., L.Wacher u. W.Hueck: Arch.exp.Path. Pharmak. 74, 450 (1913)
- (15) Pouriquand, G. u. A.Leulier: Compt.rends.soc.biol. (Paris) 93, 1314 (1925)
- (16) Sayers, G., M.A.Sayers, A.White u. C.N.A.Long: Proc.Soc.exp.Biol. 52, 200 (1943)
- (17) Sayers, G., M.A.Sayers, E.G.Fry, A.White u. S.N.H. Long: Yale J.Biol.Med. 16, 316 (1944)
- (18) Sayers, G., M.A.Sayers, T.Y.Liang, u. C.N.H.Long, Endocrinology 37, 96 (1945)
- (19) Sayers, G., M.A.Sayers, T.Y.Liang u.C.N.H.Long, Endocrinology 38, 1 (1946)

- (20) Sreter, P.A., I.L.Chaikoff u.W.G.Sauben: J.Biol.Chem. 176, 829 (1948)
- (21) Solomon, S., P.Levitaw u.S.Bieberman: Rev.Can.Biol. 15, 829 (1948)
- (22) Shimizu, K., M.Hayano, M.Gut u.R.J.Dorfman: J.Biol. Chem. 236, 695 (1961)
- (23) Shimizu, K., M.Gut u. R.J.Dorfmann: J.Biol.Chem. 237, 699 (1962)
- (24) Chaudhuri, A.C., Y.Harada, K.Shimizu, M.Gut u. R.J.Dorfmann: J.Biol.Chem. 237, 703, (1962)
- (25) Hechter, O., u.G.Pincus: Physiol.Rev. 34, 459 (1954)
- (26) Hechter, O., u. M.H.Solomon, A.Zaffarowi u. G.Pincus, Federation Prod. 13, 188 (1954)
- (27) Dailey, R.E., L.Swell u. C.R.Treadwell: Arch.Biochem. 99, 334 (1962)
- (28) Dailey, R.E., L.Swell, C.R.Treadwell: Arch.Biochem. 100, 360 (1963)
- (29) Dailey, R.E., L.Swell, H.Field jr. u. C.R.Treadwell: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 105, 4 (1960)
- (30) Dailey, R.E., L.Swell, C.R.Treadwell: Proc.Soc. Exptl.Biol.Med. 110, 571 (1962)
- (31) Hikasa, Y., M.Nagase, H.Fukuda u. R.Muracka: Proc. Symp.Chem.Physiol.Path. 3, 89 (1963)
- (32) Roberts, K.D., L.Bandi, H.J.Calvin, W.D.Drucker u. S.Liebermann: J.Amer.Chem.Soc. 86, 958 (1964)
- (33) Drayer, N.M., D.Roberts, L.Bandi u. S.Liebermann: J.biol.Chem. 239, 3112 (1964)
- (34) Popjak, G.J.: J.Path.Bact. 56, 485 (1944)
- (35) Eberhagen, D., F.Lindlar u. N.Zöllner; Zschr.ges. exp.Med. 137, 447 (1963)
- (36) Eberhagen, D. u. G.Plette: Z.physiol.Chem. 343, 17 (1965)
- (37) Riley, C.: Biochem.J. 87, 500 (1963)
- (38) Holman, R.T.: Essential fatty acids. In: F.A.Kumme-row: Metabolism as related to atherosclerosis. S.186 C.C.Thomas Publ., Springfield (III.) 1965

- (39) Tamaki, J.: Arch.japan.Chir. 30, 611 (1961)
- (40) Brown, J.B., R.A.Knouff, M.M.Conlin u. B.M.Schneider:
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 37, 203 (1937)
- (41) Olesow, M.C., u. W.R.Blook: J.Biol.Chem. 141, 349 (1951)
- (42) Eberhagen D. u. F.Leupold: unveröffentlicht
- (43) Ault, W.C., u. J.B.Brown: J.Biol.Chem. 107, 607 (1934)
- (44) Klenk, E., u. J.Dittmer: Z.physiol.Chem. 244, 203 (1936)
- (45) Riemenschneider, R.W., S.F.Herb u. P.J.Nicholas jr.:
J.Amer.Oil Chem.Soc. 26, 371 (1949)
- (46) Klenk, E., u. D.Eberhagen: Z.physiol.Chem. 322, 258 (1960)
- (47) Krickau, G., u. W.H.Hauss: Ärztl.Forschung 13, 187 (1959)
- (48) Herdenstam, C.G.: Acta med.scand. 166, 475 (1960)
- (49) Green, D.E., u. S.Fleischer: Biochem.Biophys.Acta
(Amst.) 70, 554 (1963 b)
- (50) MacFarlane, M.G., G.M.Gray u. L.W.Wheeldon: Biochem.J.
77, 626 (1960)
- (51) Getz, G.S., W.Bartley, F.Stripe, B.M.Notton u.
A.Renshaw: Biochem.J. 83, 181 (1961)
- (52) Ito, T., u. R.M.Johnson: J.Biol.Chem. 239, 3201 (1964)
- (53) Gurr, J., J.B.Finean u. J.N.Hawthorne: Biochem.
Biophys.Acta 70, 406 (1963)
- (54) Marinetti, G.V., J.Erbland u. E.Stotz: J.Biol.Chem.
233, 562 (1962)
- (55) Biezenski, J.J., T.H.Spaet u. A.L.Gordon: Biochem.
Biophys.Acta 70, 75 (1963)
- (56) Gray, G.M., u. M.G.MacFarlane: Biochem.J. 81, 480 (1961)
- (57) Eberhagen, D.: Z.physiol.Chem. 333, 179 (1963)
- (58) Volkin, Z., u. W.E.Cohn: Estimation of Nucleic Acids
In: D.Glick Methods of Biochemical Analysis Vol. I,
S.287 Interscience Publ.Inc., New York-London 1957
- (59) Folch, J., M.Lees, u. G.H.S.Stanley: J.biol.Chem.
226, 497 (1957)

- (60) Zak, B., N.Moss, A.J.Boyle u. A.Zlatkis: Analyt. Chem. 26, 776 (1954)
- (61) Bartlett, G.R.: J.biol.Chem. 234, 466 (1959)
- (62) Zöllner, N., u.G.Wolfram: Klin.Wschr. 40, 1101 (1962)
- (63) Eberhagen, D.: Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels in den Nebennieren von Ratten. Habilitationsschrift München 1966
- (64) Eberhagen, D., In: N.Zöllner u. D.Eberhagen, Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut. S.155 ff Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965
- (65) Craig, B.M., u. N.L.Murty: J.Amer.Oil Chem.Soc. 36, 549 (1959)
- (66) Eberhagen, D., u. N.Zöllner: Z.ges.exptl.Med. 138, 581 (1965)
- (67) Long, C.N.H.: Bull.N.Y.Acad.Med. 23, 260 (1947)
- (68) Cushman jr., P., C.Dickson u. J.G.Hilton: J.clin. Invest. 43, 1270 (1964)
- (69) Chang, T.-C.L., u. C.C.Sweeley: J.Lipid-Res. 2, 170 (1962)
- (70) Fukuda, H.: Arch.japan.Chir. 34, 529 (1965)
- (71) Brot, N., W.J.Lossow u. J.L.Chalkoff: J.Lipid.Res. 5, 63 (1964)
- (72) Goodmann, D.S., D.Deykin u. T.Shiratori: J.Biol.Chem. 239, 1335 (1964)
- (73) Gidez, L.I.: Biochem.Biophys.Rs.Comm. 14, 413 (1964)
- (74) Moore, J.H., u. L.D.Williams: Biochem.biophys.Acta (Amst.) 116, 181 (1966)
- (75) Eberhagen, D., R.Hartung u.N.Zöllner: Strahlentherapie 126, 601 (1965)
- (76) Ishimaru, H.: Arch.japan.Chir. 31, 536 (1962)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Poliklinik der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Seitz in dessen Isotopenlabor unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. D. Eberhagen ausgeführt.

Mein besonderer Dank für die Themenstellung, sowie für fördernde und anregende Diskussion gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. W. Seitz.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. D. Eberhagen für die persönliche Betreuung und richtungsweisende Führung bei dieser Arbeit danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein G. Plette und Fräulein B. Wittmann, deren praktische Hilfe mir sehr wertvoll war.

LEBENS LAUF

Personalien: Otto Hauck, geb. am 2.6.1939 in Landau/Pfalz
ältestes von zwei Kindern, röm.-kath., ver-
heiratet, deutsche Staatsangehörigkeit

Eltern: Hermann Hauck u. Elisabeth, geb. Fell.
Beruf des Vaters: Lehrer

Schulbesuch: 1946-1950 Volksschule in Lindenberg/Pfalz
1950-1959 Neusprachliches und Naturwissen-
schaftliches Gymnasium in Neustadt/Weinstraße
Reifeprüfung: 27.2.1959

Bundeswehr: 1.4.1959-30.9.1960

Studium: WS 1960/61 - SS 1966 Universität München
Studium der Medizin
Examen SS 1966

